

NKG2Dリガンドを介したInnate Immunityによる肺癌 免疫治療の開発

著者	西條 康夫
URL	http://hdl.handle.net/10097/41280



NKG2D リガンドを介した **Innate Immunity** による肺癌免疫治療の開発

(課題番号：13670588)

平成 13 年度～平成 14 年度科学研究費補助金

(基盤研究 (C) (2))

研究成果報告書

平成 15 年 5 月

研究代表者 西條 康夫

東北大学大学院医学系研究科 助教授

はしがき

研究組織

研究代表者：西條 康夫（東北大学大学院医学系研究科 助教授）
研究分担者：徳江 豊 （東北大学医学部附属病院 助手）

交付決定額 (金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	2,200	0	2,200
平成 14 年度	1,400	0	1,400
総計	3,600	0	3,600

研究発表

- (1) 学会誌等（後述）
- (2) 口頭発表（後述）
- (3) 出版物（後述）

(6) 研究発表

1) 学会誌等

1. Kawamoto Naoki, Akira Yamada, Ohkouchi Shinya, Tomoyuki Maeda, Shouko Tanaka, Takashi Hashimoto, Yasuo Saijo, Shinobu Saijo, Toshihiro Nukiwa, Shigeki Shichijyo, Hisamiti Aizawa, Kyogo Itoh. IgG reactive to CTL-directed epitopes of self-antigens is either lacking or unbalanced in atopic dermatitis patients. *Tissue Antigens*, 61; 352-361, 2003.
2. Kazuhiro Usui, Yasuo Saijo, Ko Narumi Shohei Koyama, Makoto Maemondo, Toshiaki Kikuchi, Ryushi Tazawa, Koichi Hagiwara, Yoshitomo Ishibashi, Shigeo Ohta, and Toshihiro Nukiwa. N-terminal deletion augments the cell-death inducing activity of BAX in adenoviral gene delivery to non-small cell lung cancers. *Oncogene* 22: 2655-2663, 2003.
3. Seiji Yano, Hiroshi Nokihara, Akihiko Yamamoto, Hisatsugu Goto, Hirohisa Ogawa, Takanori Kanematsu, Toyokazu, Miki, Yasuo Saijo, Toshihiro Nukiwa, Yasukazu Ohmoto, and Saburo Sone. Multifunctional interleukin-1 α promotes metastasis of human lung cancer cells in SCID mice by enhancing tumor-cell potential of adhesion, invasion and angiogenesis. *Cancer Science* 94: 244-252, 2003.
4. Akira Inoue, Yasuo Saijo, Makoto Maemondo, Kazunori Gomi, Yutaka Tokue, Yuichiro Kimura, Masahito Ebina, Toshiaki Kikuchi, Takuya Moriya, and Toshihiro Nukiwa. Severe Acute Interstitial Pneumonia and Gefitinib, *Lancet*, 361: 137-139, 2003.
5. Yasuo Saijo, Masashi Tanaka, Makoto Miki, Kazuhiro Usui, Takuji Suzuki, Makoto Maemondo, Xin Hong, Ryushi Tazawa, Toshiaki Kikuchi, Kouji Matsushima, and Toshihiro Nukiwa. Proinflammatory cytokine interleukin-1 α promotes tumor growth of Lewis lung carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction. *J Immunol*, 169: 469-475, 2002.
6. Shinya Ohkouchi, Akira Yamada, Nobue Imai, Takashi Mine, Kenji Harada, Shigeki Shichijyo, Yoshiaki Maeda, Yasuo Saijo, Toshihiro Nukiwa, and Kyogo Itoh. Non-mutated tumor-rejection antigen peptides elicit type-I allergy in the majority of healthy individuals. *Tissue Antigens*, in press, 2002.
7. Osamu Ishimoto, Yasuo Saijo, Ko Narumi, Yuichiro Kimura, Nobumichi Matsubara, Noboru Asou, Yushi Nakai, Masahito Ebina, Toshihiro Nukiwa. High level of vascular endothelial growth factor (VEGF) in pleural effusion. *Oncology*, 63: 70-75, 2002.
8. Makoto Maemondo, Ko Narumi, Yasuo Saijo, Kazuhiro Usui, Minoru Tahara,

- Ryushi Tazawa, Koichi Hagiwara, Kunio Matsumoto, Toshikazu Nakamura, Toshihiro Nukiwa. Targeting angiogenesis and HGF function using an adenoviral vector expressing the HGF antagonist NK4 for cancer therapy. *Mole Ther*, 5: 177-185, 2002.
9. Prasenohadi Pradono, Ryushi Tazawa, Makoto Maemondo, Masashi Tanaka, Kazuhiro Usui, Yasuo Saijo, Koichin Hagiwara and Toshihiro Nukiwa. Gene transfer of thromboxane (TX) A₂ synthase and prostaglandin (PG) I₂ synthase antithetically altered tumor angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res*, 62: 63-66, 2002.
 10. Yasuo Saijo, Sato George, Kazuhiro Usui, Masami Sato, Motoyasu Sagawa, Takashi Kondo, Yuko Minami, and Toshihiro Nukiwa. Expression of nucleolar protein p120 predicts poor prognosis in patients with stage-I lung adenocarcinoma. *Ann Oncol*, 12: 1121-1125, 2001
 11. Shin-Ichiro Iwakami, Yasuhiro Setoguchi, Yasuo Saijo, Miyuki Azuma, and Yoshinosuke Fukuchi. Replication-deficient adenovirus-mediated transfer of B7-1 (CD80) cDNA induces anti-tumor immunity in isolated human lung cancer. *Respirology*, 6: 135-144, 2001.
 12. Junichi Saito, Yushi Nakai, Yasuo Saijo, Toshihiro Nukiwa, Sadahiro Koinumaru, Yoshifumi Matsuura, Noboru Aso, Yoshio Yamane, Tomei Tsukamoto, Tsuneo Sayama, and Takehiko Nakabayashi. A phase II trial of oral UFT plus cisplatin (CDDP) in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*, 31: 285-293, 2001.
 13. 貫和敏博、前門戸任、西條康夫：Antiangiogenic gene therapy の展開と将来 遺伝子医学 6: 449-454, 2002
 14. 田澤立之、前門戸任、臼井一裕、鳴海晃、西條康夫、萩原弘一、渡辺彰、貫和敏博：Vinorelbine が奏功した高齢者非小細胞肺癌の 1 例 癌と化学療法 18: 697-700, 2001
 15. 西條康夫：遺伝子治療の問題点と将来展望 医学のあゆみ 199: 669-672, 2001

2) 口頭発表

1. Suzuki T, Fukuhara T, Tanaka M, Saijo Y, Kikuchi T, Tazawa R, Hagiwara K, and Nukiwa T. Induction of antitumor immunity by fusion of cancer cells with APCs: Comparison of allogeneic vs. syngeneic and dendritic cells vs. macrophages. AACR 93st Annual Meeting, San Francisco, 2002.4.
2. Pradono P Tazaw R, Maemondo M, Tanaka M, Usui K, Kikuchi T, Saijo Y,

- Hagiwara K, and Nukiwa T. Gene transfer of prostaglandin I2 synthase increases the anti-tumor effect of indomethacin. AACR 93st Annual Meeting, San Francisco, 2002.4.
3. Maemondo M, Narumi K, Saijo Y, Usui K, Kikuchi K, Tazawa R, Hagiwara K, Takahashi M, Niitsu Y, Nukiwa T. A replication-selective adenovirus treatment for secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) producing lung cancer cells. American Society of Gene Therapy, 4th Annual Meeting, Seattle, 2001.6.
 4. Usui K, Narumi K, Koyama S, Saijo Y, Hagiwara K, Ishibahsi Y, Ohta S, Nukiwa T. Pore forming domain of bax (delta N bax without BH3 domain) effectively induces cell death in non-small cell lung cancer cells. American Society of Gene Therapy, 4th Annual Meeting, Seattle, 2001.6.
 5. 西條康夫: 肺癌治療の現状と今後の展望 第10回日本呼吸器学会東北地方会 教育セミナー 2003.2. 盛岡
 6. Makoto Maemondo, Ko Narumi, Yasuo Saijo, Toshiaki Kikuchi, Ryushi Tazawa, Koichi Hagiwara, Minoru Takahashi, Yoshiro Niitsu, Toshihiro Nukiwa. Combination gene therapy of SLPI promoter controlled replication competent adenovirus and NK4 encoding adenovirus vector for non-small cell lung cancer. 第8回日本遺伝子治療学会, 2002.7. 東京
 7. 鈴木拓児、福原達朗、中村晃、田中昌史、西條康夫、田澤立之、菊地利明、萩原弘一、貫和敏博 癌細胞と抗原提示細胞の融合細胞を用いた抗腫瘍効果の検討: syngeneic と allogeneic および樹状細胞とマクロファージの比較 第6回基盤的癌免疫研究会総会
 8. 福原達朗、田中昌史、前門戸任、菊地利明、田澤立之、西條康夫、萩原弘一、貫和敏博 50歳以下原発性肺癌の臨床的検討 第42回日本呼吸器学会総会、仙台、2002.4.
 9. 臼井一裕、鳴海晃、西條康夫、萩原弘一、太田成男、貫和敏博、改変型 Bax 遺伝子発現による肺癌細胞死誘導 第42回日本呼吸器学会総会、仙台、2002.4.
 10. 猪岡望、海老名雅仁、萩原弘一、プラセノハディプラドノ、田澤立之、西條康夫、貫和敏博 SLPI は非小細胞肺癌 (NSCLC) の増殖を抑制する 第42回日本呼吸器学会総会、仙台、2002.4.
 11. プラセノハディプラドノ、田澤立之、猪岡望、海老名雅仁、前門戸任、田中昌史、臼井一裕、菊地利明、萩原弘一、西條康夫、貫和敏博 SLPI 遺伝子導入は肺癌細胞株 A549 移植動物モデルにおいて腫瘍増殖を抑制する 第42回日本呼吸器学会総会、仙台、2002.4.
 12. 石本修、田中昌史、菊地利明、田澤立之、西條康夫、萩原弘一、貫和敏博 化

学療法+胸部同時照射を行った進行期非小細胞肺癌の再発様式 第42回日本呼吸器学会総会、仙台、2002.4.

13. 前門戸 任、鳴海 晃、西條康夫、臼井一裕、菊地利明、田澤立之、萩原弘一、高橋稔、新津要司郎、貫和敏博 SLPI 発現肺癌選択的複製アデノウイルスによるNK4 遺伝子高発現効果と抗腫瘍効果 第42回日本呼吸器学会総会、仙台、2002.4.
14. 鈴木拓司、田中昌史、菊地利明、田澤立之、西條康夫、萩原弘一、貫和敏博 縦隔または肺門リンパ節転移を認めた原発巣不明癌の検討 第42回日本呼吸器学会総会、仙台、2002.4.
15. 福原達朗、田中昌史、前門戸任、菊地利明、田澤立之、西條康夫、萩原弘一、貫和敏博 当科で経験した50歳以下原発性肺癌の臨床的検討 第42回日本肺癌学会総会 2001.11.大阪
16. 臼井一裕、鳴海晃、前門戸任、田澤立之、西條康夫、萩原弘一、貫和敏博、太田成男 改変型 Bax による肺癌細胞死誘導 第42回日本肺癌学会総会 2001.11.大阪
17. 前門戸 任、鳴海 晃、西條康夫、臼井一裕、菊地利明、田澤立之、萩原弘一、高橋稔、新津要司郎、貫和敏博 SLPI 遺伝子プロモーターにより発現する複製可能なアデノウイルスを用いた非小細胞肺癌特異的遺伝子治療 第42回日本肺癌学会総会 2001.11.大阪
18. 石本修、鈴木拓児、田中昌史、前門戸任、菊地利明、田澤立之、西條康夫、海老名雅仁、萩原弘一、貫和敏博 当科における癌性胸膜炎の治療成績と合併症、特に OK-432 の肺傷害の検討 第42回日本肺癌学会総会 2001.11.大阪
19. 臼井一裕、鳴海晃、西條康夫、萩原弘一、太田成男、貫和敏博 改変型 Bax 遺伝子 (pore forming domain of Bax; DeltaN Bax without BH3 domain) 発現による肺癌細胞死誘導 第60回日本癌学会総会 2001.9. 横浜
20. 田澤立之、Prasenohadi, 西條康夫、前門戸任、臼井一裕、鳴海 晃、萩原弘一、貫和敏博 : トロンボキサン(TX)A2 合成酵素遺伝子/プロスタグランジ(PG)I2 合成酵素遺伝子導入は腫瘍内血管増殖に影響する. 第60回日本癌学会総会 2001.9. 横浜
21. 前門戸 任、鳴海 晃、西條康夫、臼井一裕、菊地利明、田澤立之、萩原弘一、高橋稔、新津要司郎、貫和敏博 SLPI 遺伝子プロモーターを用いた複製可能アデノウイルスベクターによる非小細胞肺癌特異的遺伝子治療 第60回日本癌学会総会 2001.9. 横浜
22. Usui K, Narumi K, Koyama S, Saijo Y, Hagiwara K, Ishibahsi Y, Ohta S, Nukiwa T. Pore forming domain of bax (delta N bax without BH3 domain) effectively induces

cell death in non-small cell lung cancer. 第7回日本遺伝子治療学会 2001.7. 東京

23. 臼井一裕、西條康夫、中邨裕之、菅原俊一、中井祐之、貫和敏博 非切除進行期非小細胞肺癌に合併した脳転移に対するγナイフ治療 第41回日本呼吸器学会 2001.4. 東京
24. 前門戸 任、鳴海 晃、西條康夫、菊地利明、田澤立之、萩原弘一、高橋稔、新津要司郎、貫和敏博 Secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) 遺伝子プロモーターを用いた肺癌特異的遺伝子治療 第41回日本呼吸器学会 2001.4. 東京

3) 出版物

1. 西條康夫、前門戸 任、菊地利明、貫和敏博 (末舛 恵一 監修) 先端医療シリーズ 20・癌 肺癌の最新医療 HGF アンタゴニスト (HGF/NK4) 遺伝子治療 pp291-297, 先端医療技術研究所、東京、2003.
2. 西條康夫 (飛田 渉、長井厚志、大田健) 気道・肺の腫瘍 肺癌の遺伝子治療 pp251-256, Medical View、東京、2003.
3. 西條康夫、貫和敏博 (酒井紀、早川弘一、西崎統、小林祥泰、福井次矢編集): 認定医・専門医のための内科学レビュー2002 肺腫瘍 pp. 19-22, 総合医学社、東京、2002

(7) 研究成果による工業所有権の出願・取得状況
なし

(8) 研究成果

始めに

癌細胞を認識し攻撃する免疫担当細胞には、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) だけでなく、NK 細胞、NKT 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、マクロファージなど innate immunity (自然免疫) によるものがある。CTL は癌細胞上の MHC class I 上に提示される癌抗原ペプチドを認識して、癌細胞を攻撃するが、最近の免疫分子生物学の進歩により、CTL が認識するペプチドが同定されるようになった。しかしヒト癌細胞においては MHC class I の発現低下がしばしば認められ、CTL のみによる免疫治療には限界がある。一方、癌転移の抑制などに重要な働きをする NK 細胞や NKT 細胞は癌細胞を認識し攻撃する事は知られていたが、その認識機構は長らく不明であった。NK 細胞膜上に発現する受容体の中で NKG2D は細胞内に ITIM モチーフが欠損している活性型受容体である。昨年と今年、ヒトおよびマウスの NKG2D リガンドが同定された。ヒトでは熱ショックなどによって発現誘導される MHC クラス I 関連分子である MICA および MICB であることが、またマウスでは MHC クラス I 関連分子で、レチノン酸で誘導される RAE-1 や H60 であることが判明した。これらの分子は癌細胞において恒常的に発現し、NK 細胞は NKG2D リガンドを認識し、殺細胞効果を発揮する。一方、細胞遊走能を持つ多数の chemokine が同定され、その機能が解析されている。最近、ユニークな構造を持つ CX3C ケモカイン Fractalkine は同定された。その受容体は T リンパ球だけでなく NK 細胞にも発現しているが抗腫瘍免疫における役割は不明である。

そこで、本研究では、癌細胞における NKG2D リガンド遺伝子導入と Fractalkine 遺伝子導入による抗腫瘍免疫反応の誘導の可能性について検討する事を目的とした。しかしながら、Ad.RAE-1 を感染させてもその効果は上皮系悪性腫瘍に対しては限定的で多くの実験は Ad.FKN を用いて行った。

方法

アデノウイルス作製

E1 及び E4 欠損 5 型アデノウイルスカセットに CMV プロモーターでドライブされるようにマウス NKG2D リガンド RAE-1 およびマウス Fractalikine 遺伝子を組み込んだ後に、293 細胞でアデノウイルスを作製した (図 1) (Ad.CMV.RAE-1, Ad.CMV.FKN)。ウイルスタイター決定後、in vitro および in vivo 実験に供した。

In vitro 実験

C26 および B16 細胞にアデノウイルスを感染させ、①RT-PCR により FKN mRNA の発現、②ウェスタンブロット法により蛋白発現を検討し、③FACS にて細胞膜表面上における RAE-1 および FKN の発現を検討し、②FKN においては単級 (THP-1) の遊走能について機能面から評価した。

In vivo 実験

次に、C26 細胞および B16 細胞にウイルスベクターを感染させた後、マウスに移植し、増殖速度を検討した。更には、細胞移植後腫瘍塊ができた後に、ウイルスベクターを腫瘍内に打ち込み腫瘍増殖の変化を検討した。更に、腫瘍組織を摘出し、浸潤細胞について検討した。また、ウイルスベクターを感染させた細胞をワクチンとして投与し、抗腫瘍効果の発現を検討した。また、腫瘍組織における T リンパ球浸潤を検討した。

結果

Ad.RAE-1 の効果

Ad.RAE-1 を B16 や C26 細胞に *in vitro* で感染させた後に、マウスの皮下に投与したところ腫瘍の増殖はコントロールと変わらず、Rae-1 の効果が認められないことが判明した（図示さず）。

Ad.FKN 発現のその機能

Ad.FKN を C26 および B15 細胞に感染させ、24 時間後に、RT-PCR で mRNA レベルを、ウェスタンブロットおよび FACS で蛋白レベルの FKN の発現を検討したところ予想するサイズのところにバンドが確認された。また、細胞膜上に発現していることが FACS で確認された（図 2）。また Ad.FKN 感染 C26 細胞上清に FKN が分泌されて機能があるかどうか確認するために培養上清を THP-1 細胞に加えその遊走誘導能について検討したところ、dose-dependent に遊走誘導能の増強が確認された（図 3）。

Ad.FKN ex vivo 感染 C26 及び B16 細胞の腫瘍増殖抑制効果

Ex vivo で C26 および B16 細胞に Ad.FKN (50moi) を感染させ、48 時間後に回収し、 3×10^5 個をマウスの皮下に移植し、増殖を観察した。C26/FKN および B16/FKN 共にコントロールに比べて有意に増殖が抑制されていた（図 4）。

Ad.FKN 腫瘍内投与による腫瘍増殖抑制効果

次に、皮下移植した C26 および B16 腫瘍に 1×10^9 pfu の Ad.FKN を腫瘍内に 1 回投与した。その結果、腫瘍の増殖が有意に抑制された（図 5）。

C26/FKN による腫瘍ワクチン効果

In vitro で Ad.FKN を感染させた C26 細胞を照射後マウスの皮下に投与し、免疫を行った。10 日後に C26 細胞を皮下にチャレンジしたところ腫瘍は生着するもののその増殖スピードは有意に抑制された（図 6）。

腫瘍の免疫組織染色

Ad.FKN を腫瘍内に投与した C26 腫瘍を摘出し、CD4 および CD8 抗体で染色したところ治療群で CD4 および CD8 の細胞がそれぞれ増加していた（図 7）。

結語

FKN は腫瘍内に CD4 および CD8 細胞の浸潤を促すことで、抗腫瘍免疫反応を誘導し、抗腫瘍効果を発揮していると考えられた。Ad.FKN は新たな免疫遺伝子治療法となりえることが示された。

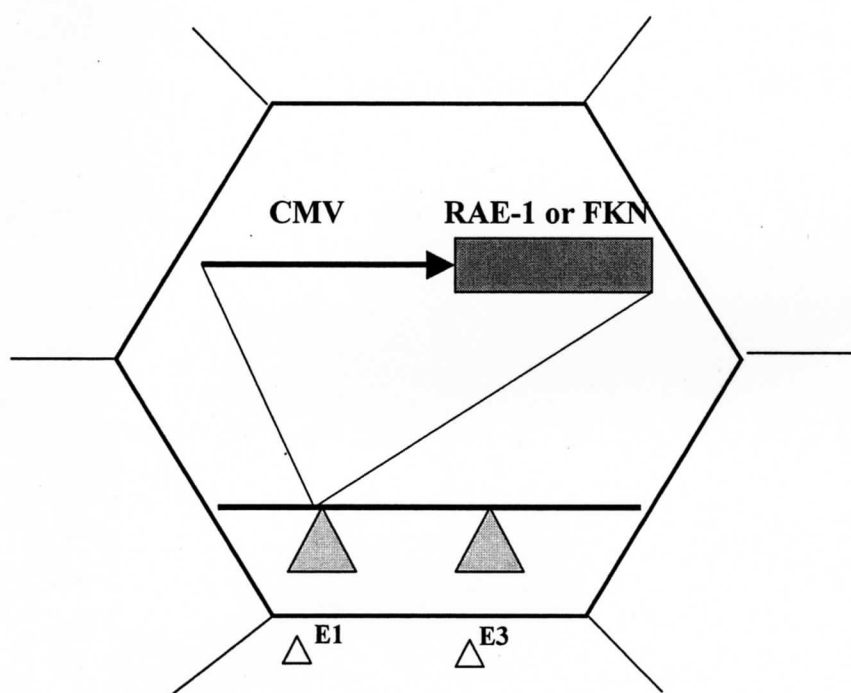


図1 マウスRAE-1およびFractalkine (FKN)発現アデノウイルスベクター

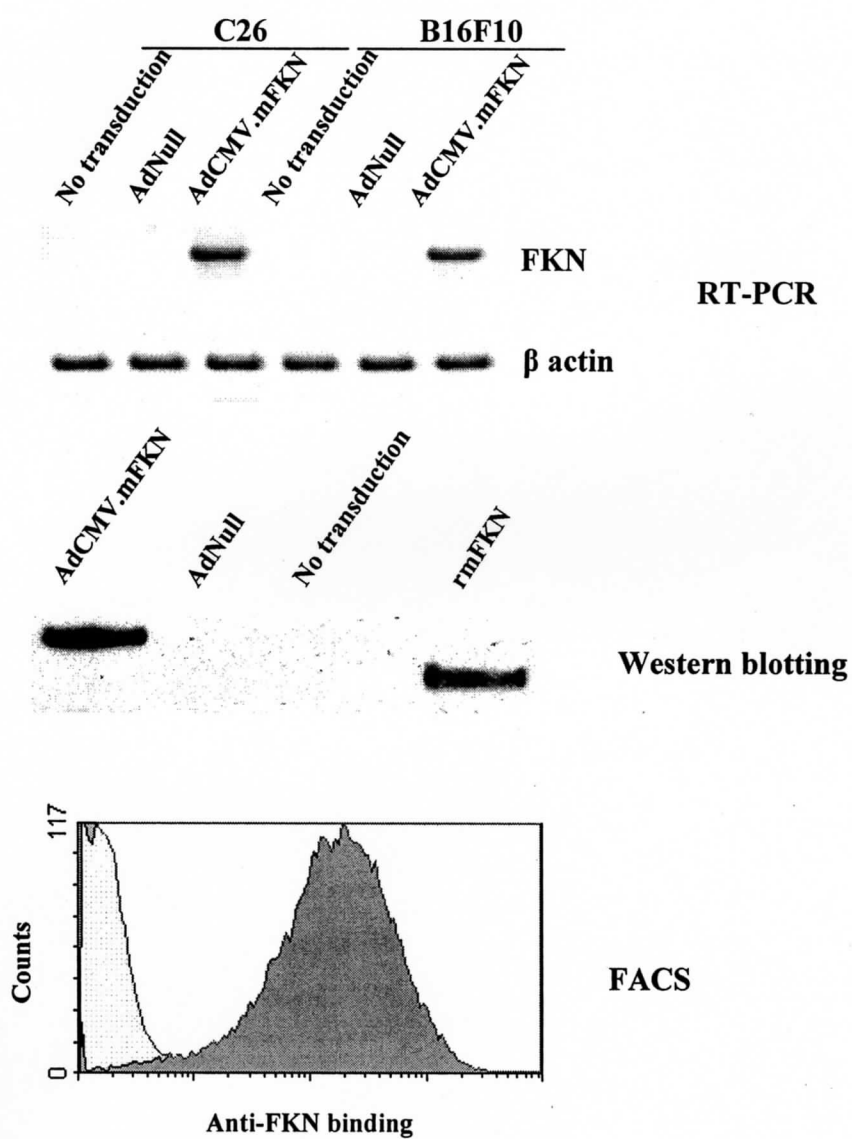


図2 Fractalkineneの発現

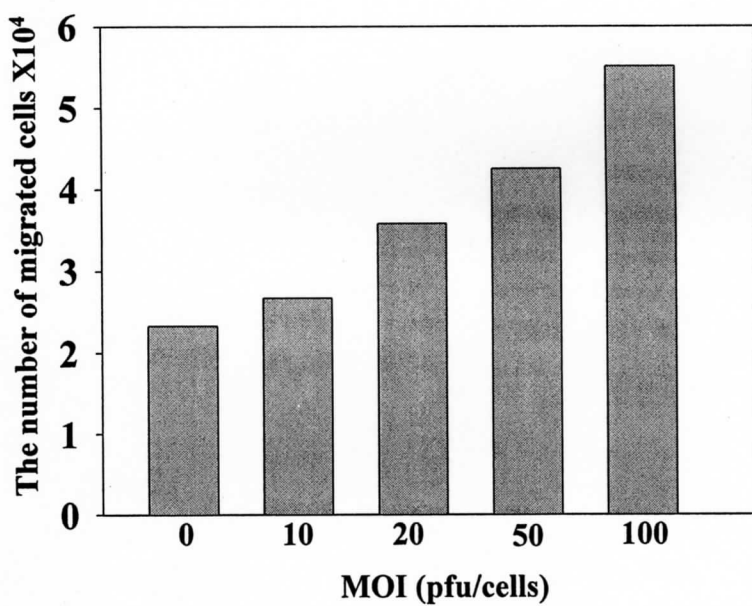


図3 FractalkineによるTHP-1細胞の遊走能

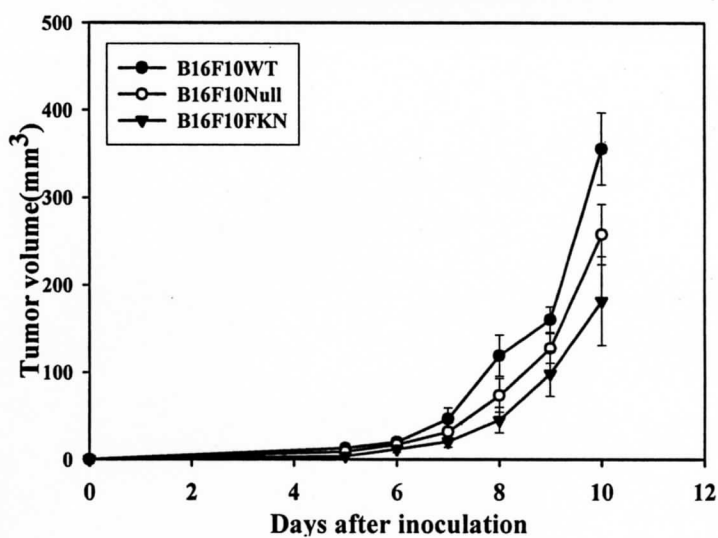
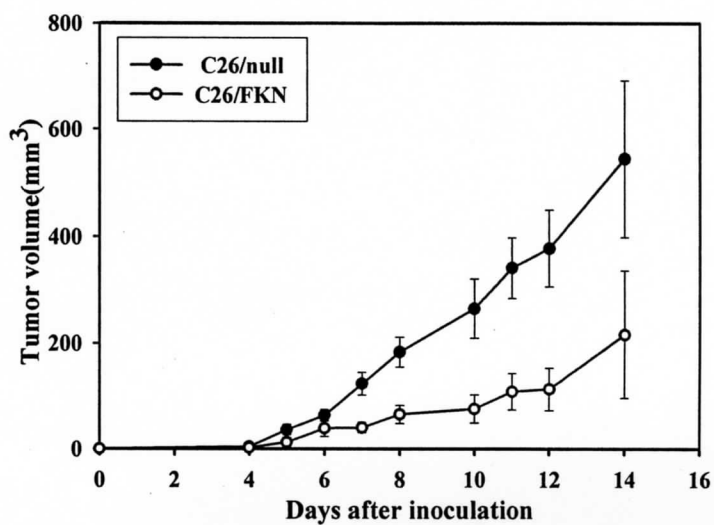


図4 ex vivo Ad.FKN感染C26細胞およびB16細胞のin vivo増殖

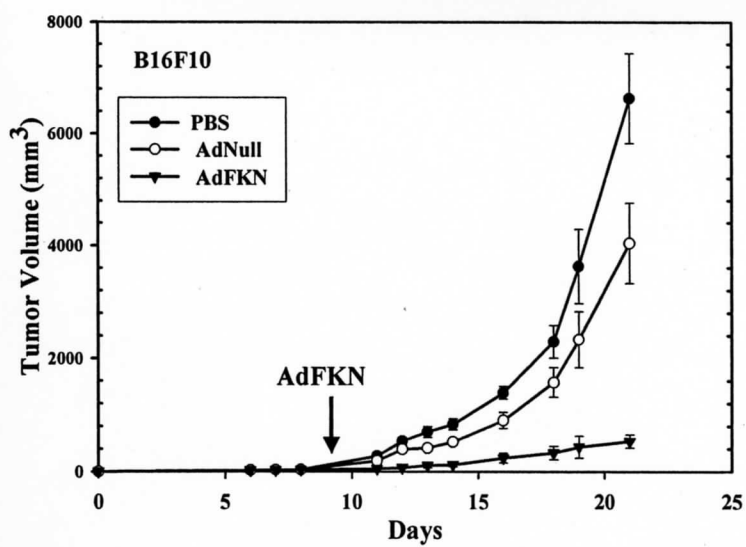
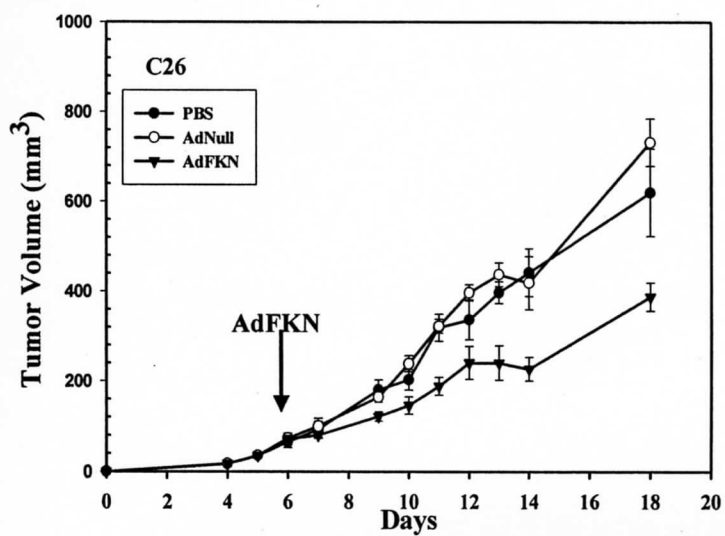


図5 C26およびB16腫瘍内Ad.FKNによる腫瘍増殖抑制効果

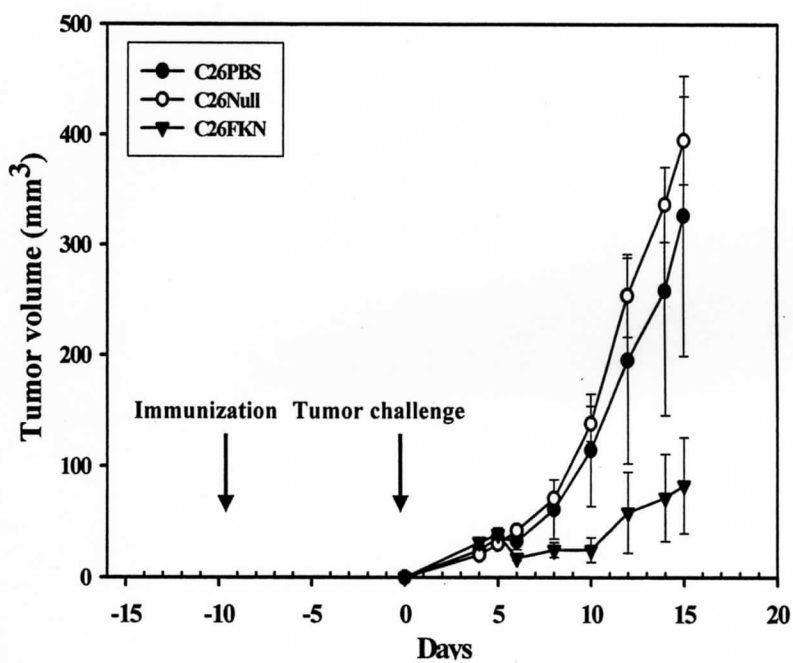


図6 Ad.FKNによる腫瘍ワクチン効果

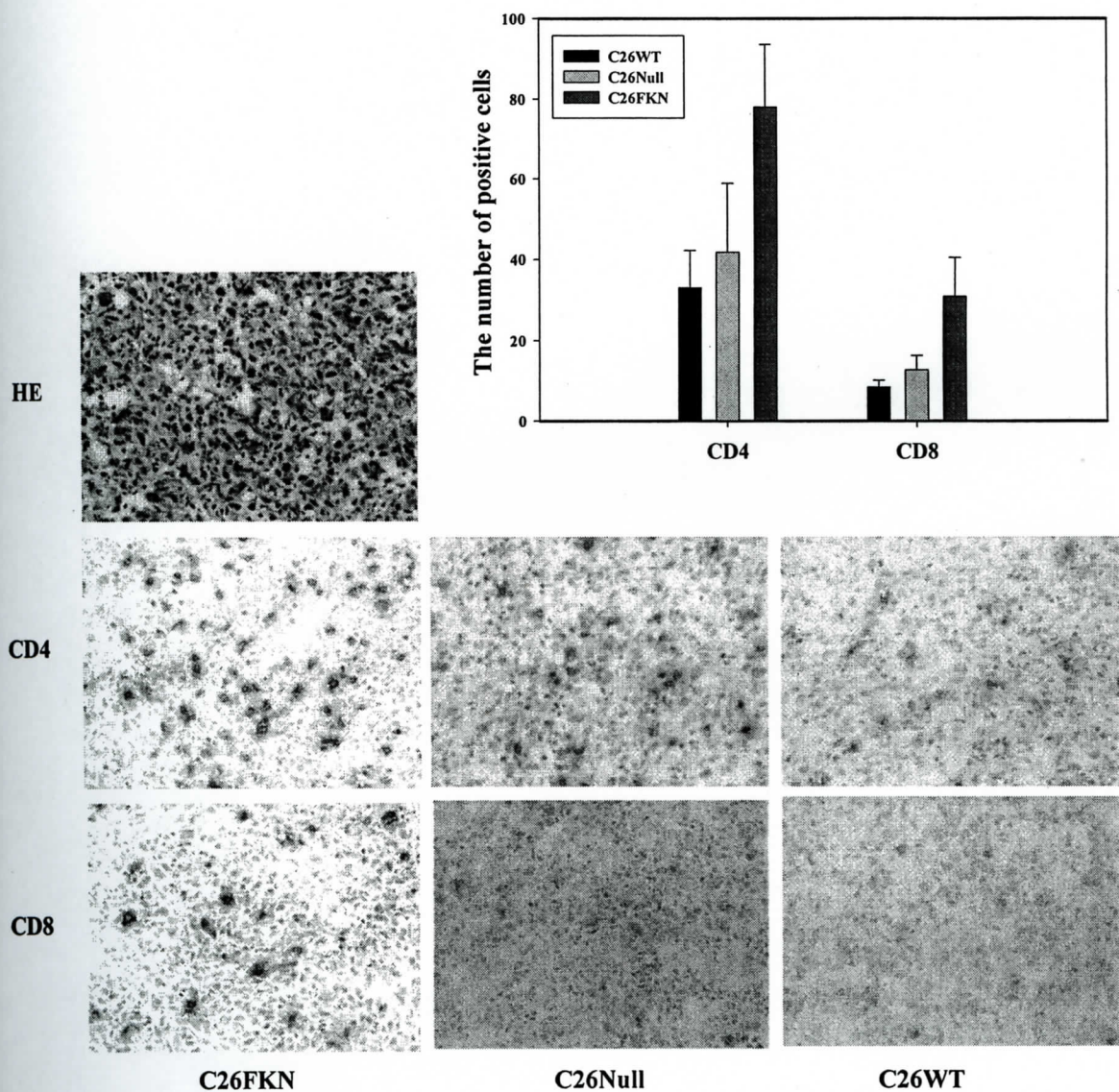


図7 Ad.FKN投与C26腫瘍における免疫細胞の浸潤

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録しておりません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。